



TITLE:

Flow cytometry による Bromodeoxyuridine(BrdU) /DNA同 時解析法の応用 2.制癌剤感受性試 験への応用のための基礎的研究

AUTHOR(S):

島袋, 智之

CITATION:

島袋, 智之. Flow cytometry によるBromodeoxyuridine(BrdU) /DNA同時解析法の応用 2.制癌剤感受性試験への応用のための基礎的研究. 泌尿器科紀要 1988, 34(8): 1349-1355

ISSUE DATE:

1988-08

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/119681>

RIGHT:

Flow cytometry による Bromodeoxyuridine (BrdU)/DNA 同時解析法の応用

2. 制癌剤感受性試験への応用のための基礎的研究

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

島 袋 智 之

APPLICATION OF SIMULTANEOUS FLOW CYTOMETRIC BROMODEOXYURIDINE (BrdU)/DNA ANALYSIS

2. BASIC STUDY TO APPLY AS A CHEMOSENSITIVITY TEST

Tomoyuki SHIMABUKURO

*From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine
(Director: Prof. J. Sakatoku)*

We developed a new method to rapidly measure the effectiveness of certain anticancer drugs by analyzing their effects on cell kinetics and cell cycle progression of labeled cells using simultaneous flow cytometric BrdU/DNA analysis. Three anticancer drugs, adriamycin (ADR), vincristine (VCR), and cisplatin (CDDP) were tested using the cultured cell line (MBT-2) originated from FANFT-induced mouse bladder tumor. The effects of these drugs were compared with percent colony survivals calculated by colony assay.

The anticancer effects (IC_{50} levels) of ADR and CDDP could be determined by analyzing the effect of the drug on cell kinetics and cell cycle progression using the aforementioned method. However, in the case of VCR no relationship was found between the effect of the drug on cell kinetics and its anticancer effectiveness. Therefore, we must search for a better parameter for VCR, such as the inhibition rate of BrdU uptake.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1349-1355, 1988)

Key words: Flow cytometry, Anti-BrdU monoclonal antibody, Chemosensitivity test

緒 言

癌の化学療法を行う際に、腫瘍細胞そのものに対する感受性を予知することは、有効にして副作用の少ない薬剤を選択するために最も重要なことの一つである。

従来、そのために各種感受性試験が行われてきたが、理想的な感受性試験とは臨床治療効果をできるだけ正確に予知し得るものであり、またその手技が簡便で迅速に結果が得られ、かつ安価であることが望ましい。従来の制癌剤感受性試験はその方法論から大別して次のようなものがある。すなわち、1) 細胞形態の変化の測定; 2) 酵素学的変化の測定; 3) 放射性前駆物質摂取率の測定; 4) コロニー形成能の測定; 5) Nude mouse 法および SRC Assay などの *in vivo* 法などである。

Flow cytometry (FCM) を用いた細胞周期の変化

を観察する方法は、数万個の細胞の有する個々の情報を瞬時に客観的に解析できるため注目されてきた。FCM の持つこの特徴を生かして、迅速で精度の高い制癌剤感受性試験の開発をめざし、第一報にて報告した BrdU/DNA 同時解析法のこの分野への応用を試み(以後本法と略す)、その可能性を検討したので報告する。

原 理

BrdU が存在すると DNA 合成期にある細胞は、thymidine の代わりに BrdU を新生 DNA 中に取り込んでしまう。これら BrdU を取り込んだ細胞に DNA 変性のための塩酸処理を行い、露出した BrdU に抗 BrdU モノクローナル抗体を反応させ、ついで FITC 標識二次抗体を反応させると、FCM を用いて取り込まれた BrdU 量に比例した FITC 蛍光強度を測定することが可能である^{1,2)}。さらに二重鎖 DNA

に結合し、赤色蛍光を発する propidium iodide (PI) を用いて同時染色を行うことにより、各細胞の DNA 合成速度を DNA 量との関係において捉えることが可能である²⁾。また、BrdU にて標識したあと経時的に細胞を採取して測定することにより、標識細胞のサイクル進行状況を知ることも可能である。したがって、BrdU にて標識された細胞に対して各種制癌剤を接触させ、その標識細胞のサイクル進行や細胞動態に及ぼす影響を対照群と比較検討することにより、各薬剤特有の細胞回転に及ぼす影響が客観的に観察できる。FCM により得られたこれら各薬剤特有の変化パターンを、colony assay のような survival curve と対比し普遍化することにより、目的とする薬剤に対する迅速な感受性試験として応用できる可能性がある。

材料と方法

実験方法

実験に使用した細胞はマウス膀胱腫瘍由来の MBT-2 細胞で、培養液は 10% FCS 添加 MEM を用いた。使用した制癌剤は、泌尿器科領域でよく用いられている adriamycin (ADR), vincristine (VCR), cisplatin (CDDP) の3剤で、いずれも用時調整した。実験方法の概略を Fig. 1 に示した。すなわち、細胞を BrdU にて標識したあと、異なる時間・濃度で薬剤と接触させ、24時間後細胞の一部を用いて FCM 解析を行い細胞回転に及ぼす影響を、残りで colony assay を行い薬剤による抗腫瘍効果を判定した。具体的には、75 cm² tissue culture flask (Corning 25110) に、 1×10^4 個の MBT-2 細胞を播種し、

4日目の対数増殖期に、BrdU の最終濃度が $10 \mu\text{M}$ になるように調整された培養液に置換して、30分間標識した。PBS にて2回洗浄したあと、細胞を ADR 接触群、VCR 接触群、CDDP 接触群、そして対照群の4群に分けた。細胞と薬剤との接触条件は2時間あるいは24時間持続接触とした。2時間接触群では最終濃度が、各々 $0.1 \mu\text{g/ml}$ (低濃度), $1 \mu\text{g/ml}$ (中濃度), $10 \mu\text{g/ml}$ (高濃度) の3濃度になるように調整された培養液に置換し、 37°C , 100% humidity の 5% CO₂ 培養器内で2時間薬剤と静置接触させた。再度 PBS にて2回洗浄し、新しい培養液を加えて引き続き22時間培養した。24時間持続接触群では、各制癌剤最終濃度が各々 $0.01 \mu\text{g/ml}$ (低濃度), $0.1 \mu\text{g/ml}$ (中濃度), $1 \mu\text{g/ml}$ (高濃度) の3濃度になるように調整された培養液に置換し、同条件下の培養器内で24時間持続接触させた。対照群には薬剤の代わりに 0.2 ml の生食水を添加した。両接触群とも、制癌剤接触開始24時間後に培養液を吸引除去し、0.1% trypsin-0.02% EDTA 液にて細胞分散を行い単離細胞浮遊液を作成した。

Colony assay の方法は、薬剤接触後の単離細胞を、最終濃度が25%になるように FCS を加えた0.3%二層軟寒天培地に1ディッシュ当たり 2.5×10^3 個播種し、 37°C で100% humidity の 5% CO₂ 培養器内で10日間培養した。倒立位相差顕微鏡を用いて、30個以上の細胞集団をコロニーとして算定し、対照と比較して抗腫瘍効果を percent (%) colony survivals として表した。

FCM による BrdU/DNA 同時測定法の詳細は第一報で述べた。すなわち、単離細胞を70%冷 ethanol

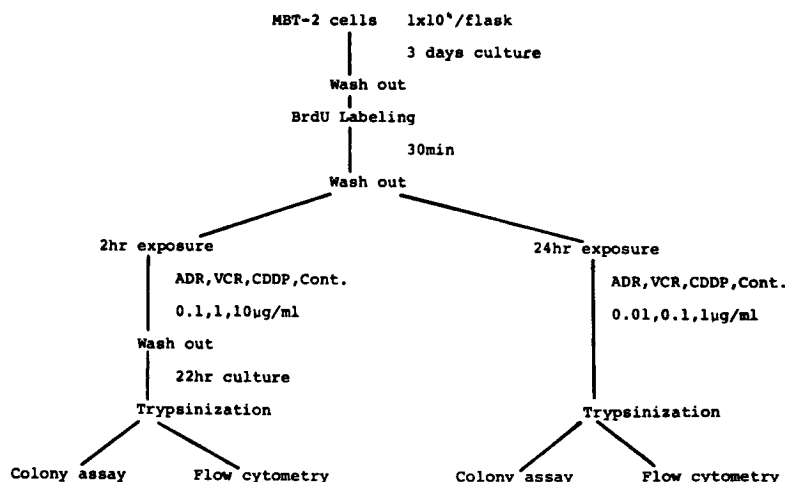


Fig. 1. Method employed in this study.

で一昼夜固定後 PBS にて2回洗浄し, 4N 塩酸で 20°C ・20分間の DNA 変性処理を行った. 塩酸を中和し, 抗 BrdU 抗体と二次抗体を順次反応させ, 最後に PI にて DNA 染色を行った. 測定装置は EPICS C Cell Sorter を用いた. 1 検体につき 2×10^4 個の細胞を測定し, 二次元座標上に表示して解析を加えた. 実験は各条件下ですべて triplicate して行った.

結 果

BrdU の毒性試験 (Fig. 2)

BrdU それ自体のコロニー形成能に及ぼす影響を調べるため, 対数増殖期にある MBT-2 細胞に最終濃度が $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$ になるように BrdU を加え, 37°C で 100% humidity の 5% CO_2 培養器内で2時間接触させた. 前述のごとく colony assay を行い, 10日間培養後に判定した結果を Fig. 2 に示した. すなわち, 対照群のコロニー形成数を 100% とすると, $10 \mu\text{M}$ の BrdU 処理群では, 95.4%, $20 \mu\text{M}$ の BrdU 処理群では 106.4% となり, この3群間には統計学的に有意な差は認めなかった ($p < 0.05$). したがって, BrdU 自体による毒性は短期的には無視できると考えられた.

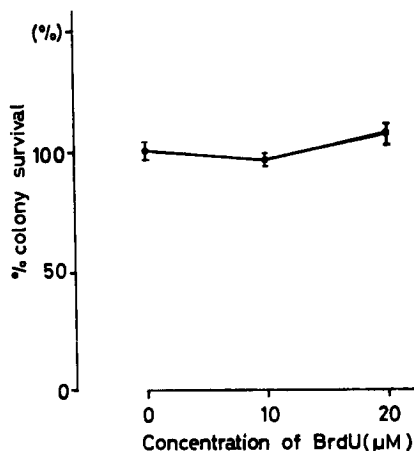


Fig. 2. Percent colony survivals of exponentially growing MBT-2 cells treated with various exposure concentrations of BrdU for 2 hours. Bar shows standard deviation.

各制癌剤の抗腫瘍効果と細胞周期に及ぼす影響

i) ADR の効果 (Fig. 3, 4)

ADR 2時間あるいは24時間接触後のコロニー形成率を Fig. 3 に示した. 2時間接触群では IC_{90} は $4 \mu\text{g/ml}$ で, 24時間持続接触群では $0.2 \mu\text{g/ml}$ であっ

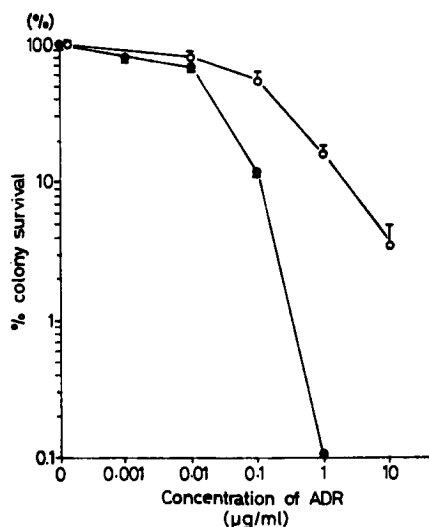


Fig. 3. *In vitro* sensitivity of MBT-2 cells to ADR. ○—○: 2 hr exposure, ●—●: 24 hr continuous exposure. Bar shows standard deviation.

た. 両接触群とも濃度依存性に抗腫瘍効果が認められた. また接触させる濃度が同濃度でも, 常に24時間接触群の方が抗腫瘍効果が強いことより, ADR においては濃度依存性ばかりでなく時間依存性の抗腫瘍効果も存在することが考えられた. ADR の細胞周期ならびに標識細胞のサイクル進行に及ぼす影響を Fig. 4a にその細胞周期各相の二次元座標上での解析結果を Fig. 4b に示した. 通常標識直後に固定染色し, BrdU/DNA 同時測定を行うと, DNA 合成速度の分布パターンは mid-S から late-S 期にかけて最も高い“逆U字型”をしている (control 0 hr). 標識後さらに培養を続け経時的に固定染色した検体では, 標識細胞が細胞回転を進むにつれ逆U字型が右に押し倒された形となり, さらに one generation time (26 hr) 後には, G_2M 期そして G_1 期を経て再度 S 期に戻ってくることを確認している. ADR 接触後の標識細胞のサイクル進行状況を対照と比較してみると, その細胞周期におよぼす影響を知ることができる. すなわち ADR 接触群では IC_{90} を示す濃度においては, 標識細胞のサイクル進行に遅延 (S 期進行遅延) と G_2M 期での block が認められた. また, 細胞回転の停止する濃度 ($1 \mu\text{g/ml}$, 24時間持続接触あるいは $10 \mu\text{g/ml}$, 2時間接触) ではコロニー形成は認められないか, きわめてわずかであった.

ii) VCR の効果 (Fig. 5, 6)

VCR 2時間接触あるいは24時間持続接触後のコロニー形成率を Fig. 5 に示した. 2時間接触群での

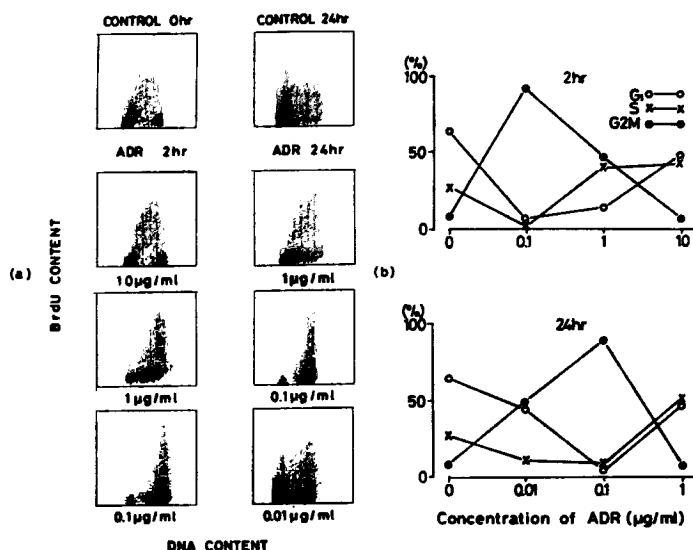


Fig. 4. (a). Bivariate BrdU/DNA distributions from pulse-chase experiments. (b). The analysis of cytokinetic effects of ADR shown in Fig. 4a.

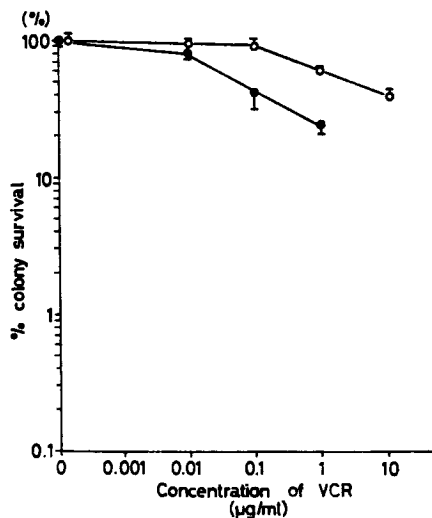


Fig. 5. *In vitro* sensitivity of MBT-2 cells to VCR. ○—○: 2 hr exposure, ●—●: 24 hr continuous exposure. Bar shows standard deviation.

IC₅₀ は 5 µg/ml で、24時間持続接触では 0.07 µg/ml であった。2時間接触群に比べ、24時間持続接触群において常に抗腫瘍効果が強かったことより、時間依存性の抗腫瘍効果が認められた。VCR の細胞周期および標識細胞のサイクル進行に及ぼす影響を Fig. 6a にその細胞周期各相の解析結果を Fig. 6b に示した。すなわち、VCR においては低濃度より、接触させる時間に関係なく G₂M 期に細胞集積をみ、中—

高濃度では著明な G₂M 期単峰性集積をきたした。このため標識細胞のサイクル進行は一過性に著明に抑制された。この低濃度よりの著明な G₂M 期細胞集積あるいは標識細胞のサイクル進行抑制にも関わらず、コロニー抑制率はわずか50%程度であった。したがって VCR の場合は、G₂M 期単峰性細胞集積の度合のみから抗腫瘍効果を判定することには、無理があると思われた。

iii) CDDP の効果 (Fig. 7, 8)

CDDP 2時間接触あるいは24時間持続接触後のコロニー形成率を Fig. 9 に示した。CDDP 2時間接触での IC₉₀ は 3 µg/ml で、24時間持続接触では 0.8 µg/ml であった。低濃度領域での抗腫瘍効果は弱く、0.1 µg/ml 以上で濃度依存性の抗腫瘍効果が認められた。また、0.1 µg/ml 以上では時間依存性の抗腫瘍効果も認められた。CDDP の細胞周期および標識細胞のサイクル進行に及ぼす影響を Fig. 8a にその細胞周期各相の解析結果を Fig. 8b に示した。すなわち、CDDP においては低濃度では細胞周期および標識細胞のサイクル進行に及ぼす影響は少なく、抗腫瘍効果を認めだす高濃度の条件 (0.1 µg/ml で24時間持続接触あるいは1 µg/ml で2時間接触) より S, G₂M 期への細胞集積と標識細胞のサイクル進行の遅延を認めだした。また、S 期相当の DNA 量を有するも DNA 合成を行っていない細胞の増加もみられた。

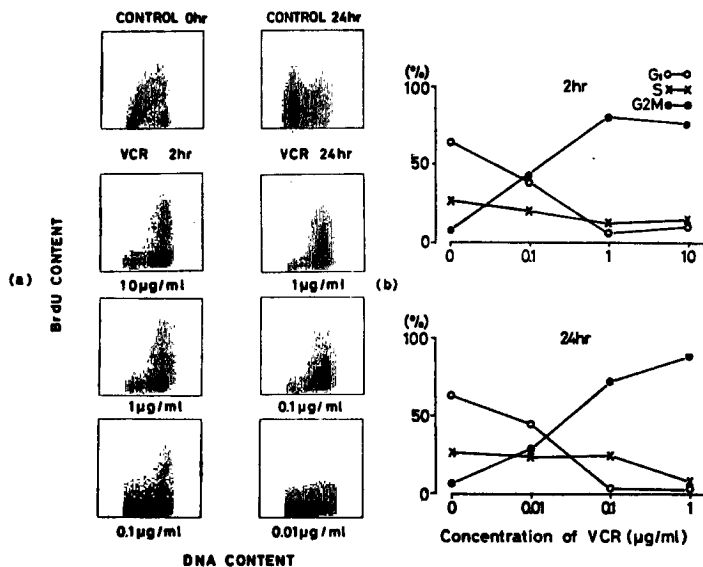


Fig. 6. (a). Bivariate BrdU/DNA distributions from pulse-chase experiments. (b). The analysis of cytokinetic effects of VCR shown in Fig. 6a.

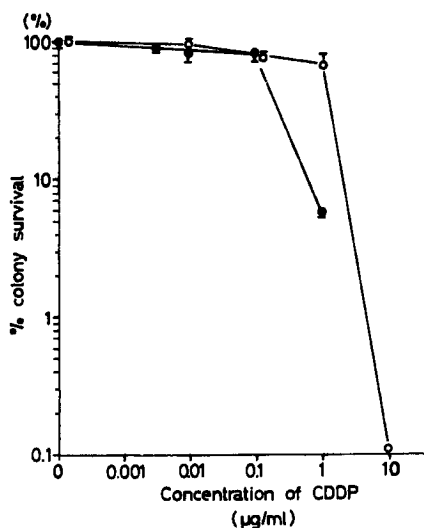


Fig. 7. *In vitro* sensitivity of MBT-2 cells to CDDP. ○—○: 2 hr exposure, ●—●: 24 hr continuous exposure. Bar shows standard deviation.

考 察

最近の FCM の臨床分野への応用には目を見張るものがある³⁾。そのひとつとして、制癌剤作用後の細胞周期に及ぼす影響を DNA 分布を解析することにより知り、より効果的な薬剤をみつけようとする試みがある^{4-6,7)}。しかしながら、DNA 分布解析から得られるのは細胞周期抑制の部位とその程度に関する情

報のみであり、これに時間的因子を加味するためには、頻回に検体処理を行い解析を加えなければならない。この煩雑さから逃れるためには、是非とも細胞を標識し、その動的变化を追跡する必要がある。そこに登場したのが thymidine の analogue である BrdU である。すなわち、BrdU で細胞を標識したあと抗 BrdU モノクローナル抗体で染色し、同時に DNA 染色を組み合わせることにより、FCM を用いて標識細胞のサイクル進行状況を視覚的にとらえることが可能となってきた。また、その解析にも複雑な数式を必要とせず、迅速かつ正確に細胞動態の変化が測定できるようになった。

BrdU は高濃度で長時間細胞に作用させると細胞毒性を発揮する⁸⁾。それゆえ標識に用いる濃度と接触時間は、可能な限り低濃度・短時間であることが望ましい。今回の BrdU の毒性実験では、20 µM、2 時間接触でも細胞の増殖には悪影響を及ぼさないことを示している。したがって、10 µM で 30 分間の標識条件では、BrdU のコロニー形成や細胞周期に及ぼす影響を無視でき、制癌剤そのものの抗腫瘍効果が判定できると考えられる。

今回の実験結果から、ADR においてはコロニー形成を対照に比べ 90% 抑制する濃度 (IC₉₀) 以上では、著明な G₂M 期での細胞集積 (block) と標識細胞のサイクル進行に遅延あるいは停止を認めている。逆に言えば、この細胞回転あるいは標識細胞のサイクル進行に及ぼす効果を知ることにより、早期にコロニー形

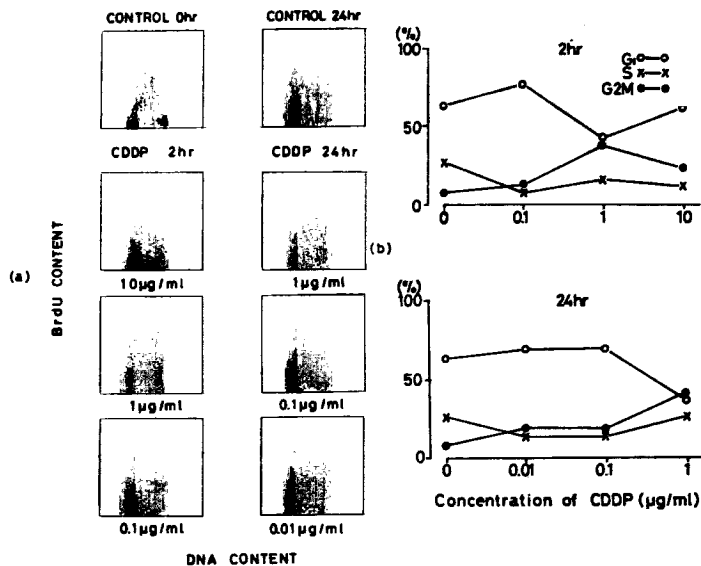


Fig. 8. (a). Bivariate BrdU/DNA distributions from pulse-chase experiments. (b). The analysis of cytotoxic effects of CDDP shown in Fig. 8a.

成に及ぼす効果, 言い換えれば IC_{50} 程度の抗腫瘍効果を判定できるということになる. 効果判定のための cut off point をどこに置くかは今後の課題ではあるが, さらに基礎的検討を加えることにより解決できると思われる. また細胞回転の停止をみる場合には, コロニー形成はゼロと判定できる. 他の抗癌性抗生物質, 例えば daunomycin あるいは neocarzinostatin もほぼ ADR と同様の細胞回転に及ぼす効果を有している^{6,9}, 本法が同様に迅速な薬剤感受性効果の判定法として適用可能と思われる.

ビンカアルカロイド剤が紡錘体毒(spindle poison)として働き, 細胞分裂を中期で阻止(metaphase arrest)する作用を示すことはよく知られている. 今回の検討結果でも, VCR は比較的低濃度より著明な G_2M 期単峰性集積を示しており, この分裂毒作用が確認された. しかしながら, VCR においては G_2M 期単峰性集積の大きさとその抗腫瘍効果とは比例しなかった. したがって, この G_2M 期に集積した細胞の一部は死滅するが, 大部分の細胞は再び増殖を続けることが分かる. 実際, VCR を接触させ G_2M 期に細胞を集積させたあと薬剤を除去しさらに培養を続けると, 細胞は再び細胞回転を回り始めることが確認されている. これらのことから, ビンカアルカロイド剤による G_2M 期細胞集積は, 抗癌性抗生物質による G_2M 期細胞集積とは異なり, 可逆性変化であることが分かる. したがって, この系統の薬剤の抗腫瘍効果を判定するには, 今回検討したパラメーターのみでは困難

であり, BrdU 取り込み抑制率などの他のパラメーターの導入が必要と思われる.

CDDP の作用機序はアルキル化剤のそれと似ている. すなわち, その構造中の Cl 基が活性化されて二つの反応基を作り, 二本鎖 DNA 間に結合し cross-links を作ることによるとされている¹⁰. その結果 DNA 二重鎖に変性をきたし, DNA 合成阻害を招き細胞に致死的变化を誘起する¹¹. 今回の検討結果から, CDDP の IC_{50} を示す件では G_2M 期細胞集積作用と標識細胞のサイクル進行遅延を認めたが, 抗癌性抗生物質とは異なり完全な G_2M ブロックは認められなかった. これは CDDP の S 期延長作用による修飾のため, G_2M ブロックが完全には表現され得なかったためと推測された. Bergerat ら⁹の検討でも S 期の進行遅延と G_2 ブロックが示され, さらに濃度を上げるか接触時間を増すと G_1 もしくは G_1 -S 境界でのブロックを招くとしている. これらのことから, CDDP の細胞回転に及ぼす効果は, 作用機序と同じくアルキル化剤に似ていると考えられた. すなわち, CDDP による細胞集積は特定の期におけるブロックではなく, サイクル進行延長作用によるものと推測された. 抗癌性抗生物質とは異なり, CDDP の細胞回転に及ぼす効果を定量化するためには G_2M 集積の大きさのみでは不可能で, 時間因子の解析が必要である. このことに関しては, まだ解決しなければならない問題があるが, 標識細胞のサイクル進行を時計の動きに合わせて動的に把握できる本

法は、この意味からも大いに期待のもてる方法と思われる。

制癌剤感受性試験の最終目標は、制癌剤の臨床効果を迅速かつ正確に予測し、癌化学療法効果を飛躍的に上げることである。この目標を達成するための条件は、1)簡便で再現性のあること、2)安価なこと、3)迅速に結果が得られること、4)高い感受性と特異性を有すること、5)臨床効果とよく相関すること、などである。しかしながら、これらの条件を完全に満足し得る試験法は残念ながら現在のところない。それゆえ、より正確な結果を得ることのできる感受性試験の開発の努力は続けられなければならない。

結 語

Flow cytometry による BrdU/DNA 同時解析法の、制癌剤感受性試験としての応用の可能性を探るため、MBT-2 細胞に種々の条件で各種制癌剤を接触させ、その細胞動態と標識細胞のサイクル進行に及ぼす効果を解析した。この方法で得られた解析結果を、同条件下で行った colony assay の survival curve と比較検討し、以下の結論を得た。

1) ADR による標識細胞のサイクル進行遅延および G₂M 期細胞集積の大きさと、抗腫瘍効果との間には相関性が認められた。したがって本法を用いることにより、IC₅₀ 程度の抗腫瘍効果を早期に推測し得る可能性がある。

2) VCR では標識細胞のサイクル進行に及ぼす作用や G₂M 期単峰性集積作用と、抗腫瘍効果との間には相関性が認められなかった。

3) CDDP による標識細胞のサイクル進行遅延および S 期、G₂M 期への細胞集積の大きさと、抗腫瘍効果との間には高濃度領域では相関性が認められた。しかし、低濃度領域での判定には困難さが伴った。

4) 以上より、ADR では G₂M ブロックと標識細胞のサイクル進行遅延、CDDP では S 期、G₂M 期への細胞集積の大きさと標識細胞のサイクル進行遅延を、FCM を用いた本法にて解析することにより、早期に抗腫瘍効果を判定し得る可能性が示唆された。しかし VCR のように、細胞周期に及ぼす影響の解析のみにては判定が難しい薬剤もあり、他のパラメーターの導入も必要と考えられた。

本論文の要旨は第24回日本癌治療学会総会(1986)にて発表した。稿を終えるにあたり、本論文の御指導、御校閲を賜りました山口大学泌尿器科学教室酒徳治三郎教授に感謝の意を表します。また、BrdU/DNA 同時染色法および Flow

cytometry 測定法に関して、終始適切な助言と御指導を頂いた、本学病理学教室高橋 学教授に深謝いたします。さらに、培養細胞を用いた感受性試験や、実験計画に際し、直接的な御指導を頂いた、本学泌尿器科学教室山本憲男助教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Gratzner HG and Leif RC: An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry* 1: 385-389, 1981
- 2) Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG and Gray JW: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5573-5577, 1983
- 3) Barthel B, Raber MN, Schumann J, Jhonson TS, Drewinko B, Swartzendruber DF, Gohde W, Andreef M and Freireich EJ: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 43: 3982-3997, 1983
- 4) Barlogie B, Drewinko B, Jhonston DA and Freireich EJ: The effect of Adriamycin on the cell cycle traverse of a human lymphoid cell line. *Cancer Res* 36: 1975-1979, 1976
- 5) Bergerat J, Barthel B, Gohde W, Jhonston DA and Drewinko B: In vitro cytotoxic response of human colon cancer cells to cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Res* 39: 4356-4363, 1979
- 6) 太田和雄, 高本 滋: 細胞回転と制癌—化学療法の立場から—. *癌の臨床* 27: 1499-1506, 1981
- 7) 篠原陽一, 松山豪泰, 川井修一, 山本憲男, 酒徳治三郎, 橋本 治 フローサイトメトリー(FCM)による cis-dichlorodiammine platinum II (CDDP) の感受性試験—感受性株と耐性株を用いた基礎的検討—. *関西フローサイトメトリー研究会機関誌* 3: 49-53, 1985
- 8) Goz B: The effects of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA of eukaryotic cells. *Pharmacological Reviews* 29: 249-272, 1978
- 9) 高木 滋, 太田和雄: 抗癌性抗生物質の細胞回転に及ぼす影響。—Flow microfluorometry 分析による—. *癌と化学療法* 6: 59-70, 1979
- 10) Horacek P and Drobnik J: Interaction of cis-dichlorodiammineplatinum (II) with DNA. *Biochim Biophys Acta* 254: 341-347, 1971
- 11) Roberts JJ and Pascoe JM: Cross-linking of complementary strands of DNA in mammalian cells by antitumour platinum compounds. *Nature* 235: 282-284, 1972

(1988年5月6日迅速掲載受付)